



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 42 04 476 A 1**

⑤1 Int. Cl. 5:-
C 12 N 9/26
C 12 N 15/56
C 12 N 1/21
// (C12N 15/56, C12R
1:07)C12N 15/66
(C12N 1/21, C12R
1:19)C12N 15/70

DE 42 04 476 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 42 04 476.6
㉔ Anmeldetag: 14. 2. 92
㉕ Offenlegungstag: 20. 8. 92

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
15.02.91 JP 22405/91 30.09.91 JP 250012/91

⑦1 Anmelder:
Kikkoman Corp.; Noda Institute for Scientific
Research, Noda, Chiba, JP

⑦4 Vertreter:
Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Tauchner, P.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann, D., Dipl.-Phys.
Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Hermann, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Schmidt, J.,
Dipl.-Ing.; Jaenichen, H., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anwälte; Tremmel, H., Rechtsanw., 8000
München

⑦2 Erfinder:
Oguma, Tetsuya; Matsuyama, Asahi; Nakano, Eiichi;
Kikuchi, Mamoru, Noda, Chiba, JP

⑤4 Cyclodextrinase-Gene und Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinase

⑤7 Die vorliegende Erfindung stellt ein aus *Bacillus sphaericus* E-244 (FERM BP-2458) isoliertes, ein Cyclodextrinase-Gen enthaltendes DNA-Fragment bereit. Das Cyclodextrinase-Gen codiert für eine in SEQ ID Nr. 1 gezeigte Aminosäuresequenz. Die vorliegende Erfindung stellt außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinase bereit, das das Kultivieren eines zu der Gattung *Escherichia* gehörenden eine rekombinante DNA mit dem Cyclodextrinase-Gen enthaltenden Mikroorganismus in einem Kulturmedium und das Gewinnen von Cyclodextrinase aus der Kultur umfaßt.

DE 42 04 476 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Cyclodextrinase-Gen enthaltende neue rekombinante DNA und ein Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinase unter Verwendung der rekombinanten DNA.

Cyclodextrinase ist ein Enzym, das unter spezifischer Spaltung von $\alpha(1 \rightarrow 4)$ Bindungen des Cyclodextrins dieses hydrolysiert und zu linearen Maltooligosacchariden führt, die den gleichen Glucose-Polymerisationsgrad wie das ursprüngliche Cyclodextrin aufweisen. Daher ist die Cyclodextrinase geeignet zur Herstellung von Maltooligosacchariden, wie Maltoheptaose. Lineare Maltooligosaccharide mit dem gleichen Glucose-Polymerisationsgrad wie Cyclodextrin werden nach bekanntem Verfahren effizient unter Verwendung von Cyclodextrinase hergestellt.

In diesem Verfahren wird Cyclodextrinase durch Reinigen einer aus Zellen des kultivierten *Bacillus sphaericus* E 244 (JP-OS Nr. 1 52 257/1989) isolierten ungereinigten Cyclodextrinase hergestellt.

In dem vorgenannten Verfahren ist jedoch die Ausbeute an Cyclodextrinase sehr gering.

Es ist auch ein Verfahren zur Herstellung von großen Mengen an Cyclodextrinase aus der JP-OS Nr. 22 405/1991 bekannt. In diesem Verfahren wird ein ein Cyclodextrinase-Gen enthaltendes DNA-Fragment in eine Vektor-DNA inseriert. Anschließend werden Bakterien der Gattung *Escherichia* mit der rekombinanten DNA transformiert. Erfolgreich transformierte Bakterien werden zur Herstellung des Enzyms gezüchtet.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinase auf mikrobiologischem Weg bereitzustellen. Die Lösung dieser Aufgabe ergibt sich aus der nachstehenden Beschreibung und den Patentansprüchen.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der erfolgreichen Isolierung eines Cyclodextrinase-Gens von *Bacillus sphaericus* E-244 und der Aufklärung seiner Struktur (Sequenz).

Somit betrifft die Erfindung ein Cyclodextrinase-Gen, das für die in SEQ ID Nr. 1 beschriebene Aminosäuresequenz codiert.

Die Erfindung betrifft ferner ein Cyclodextrinase-Gen mit der in SEQ ID Nr. 4 beschriebenen Nukleotidsequenz.

Die Erfindung betrifft ferner eine rekombinante DNA, die das Cyclodextrinase-Gen enthält.

Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinase, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man zur Gattung *Escherichia* gehörende Mikroorganismen, die eine rekombinante DNA mit dem Cyclodextrinase-Gen enthalten, in einem Kulturmedium züchtet und die gebildete Cyclodextrinase aus der Kultur isoliert.

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend näher erläutert.

Zunächst wird die Gewinnung des Cyclodextrinase-Gens erläutert. Jeder zur Gattung *Bacillus* gehörende Mikroorganismus, der ein Cyclodextrinase-Gen aufweist, kann als Spender verwendet werden. Bevorzugt ist *Bacillus sphaericus* E-244 (der unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-2458 am 8.06.1989 beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology hinterlegt wurde). Das Bakterium wird unter den gleichen aeroben Bedingungen wie es für typische Mikroorganismen verwendet wird kultiviert, beispielsweise durch Schüttelkultur oder durch Belüften und Rühren eines flüssigen Mediums. Das Kulturmedium kann eine Stickstoffquelle, Kohlenstoffquelle, Vitamine, Mineralstoffe und Cyclodextrin als Enzym induzierendes Substrat enthalten. Der pH-Bereich des Kulturmediums kann dem für das Wachstum der Bakterien geeigneten Bereich entsprechen, vorzugsweise 6 – 8. Die Kultivierung kann in einem Schüttler oder in einem Belüftungsrührfermenter während 16 bis 96 Stunden bei 20 bis 40°C durchgeführt werden. Nach beendetem Wachstum wird die Kultur mindestens 5 Minuten, vorzugsweise 10 bis 15 Minuten, bei 700 × g, vorzugsweise 5000 bis 8000 × g, zentrifugiert. Aus den erhaltenen *Bacillus sphaericus* E-244-Zellen wird die chromosomale DNA nach dem von Saito und Miura in *Biochem. Biophys. Acta*, Bd. 72 (1963), 619 beschriebenen Verfahren extrahiert. Die chromosomale DNA wird anschließend zur Erzeugung adhäsiver Enden mit einem Restriktionsenzym, wie *Bam*HI (1 – 10 Einheiten/ml) während 20 Minuten, vorzugsweise 30 bis 120 Minuten, bei 30°C, vorzugsweise 37°C gespalten. Verschiedene so erhaltene Restriktionsfragmente werden in an sich bekannter Weise gereinigt. Die Restriktionsfragmente werden mit Phenol und sodann mit Phenol/Chloroform extrahiert und gegebenenfalls mit Ethanol präzipitiert.

Als Vektor-DNA kann jeder beliebige Vektor einschließlich Plasmid- und Bakteriophagen-Vektoren, insbesondere das Plasmid pUC118 (Takara Shuzo Co., Ltd.), verwendet werden. Die Vektor-DNA wird anschließend zur Erzeugung adhäsiver Enden mit einem Restriktionsenzym, wie *Bam*HI (10 – 1000 Einheiten/ml) während 60 Minuten oder mehr, vorzugsweise 1 bis 3 Stunden, bei 30°C, vorzugsweise 37°C, gespalten. Die so erhaltenen gespaltenen Vektoren werden in an sich bekannter Weise gereinigt. Die gespaltenen Vektoren werden mit Phenol und sodann mit Phenol/Chloroform extrahiert und gegebenenfalls mit Ethanol präzipitiert.

Die das Cyclodextrinase-Gen enthaltenden Restriktionsfragmente von *Bacillus sphaericus* E-244 werden mit der gespaltenen Vektor-DNA gemischt. Zu dem DNA-Gemisch wird DNA-Ligase (1 – 100 Einheiten) *E. coli* DNA-Ligase (New England Biolabs) oder T4 DNA-Ligase (Boehringer Mannheim), vorzugsweise T4 DNA-Ligase gegeben. Das Reaktionsgemisch wird dann 1 Stunde oder länger, vorzugsweise 6 bis 24 Stunden, bei 4 bis 37°C, vorzugsweise 4 bis 16°C, inkubiert. Ein kommerziell erhältlicher Ligasekit (Takara Shuzo Co., Ltd.) kann in diesem Ligaseverfahren verwendet werden. Die so erhaltene rekombinante DNA wird zur Transformation oder Transduktion von *E. coli* HB101 (ATCC 33694), JM101 (ATCC 33876), JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.), Dill (ATCC 33849) oder χ -1776 (ATCC 31244) nach dem von Morrison, D.A. in *Methods in Enzymology*, Bd. 68 (1979), 326 – 331, beschriebenen Transformationsverfahren oder nach dem von Hohn B., in *Methods in Enzymology*, Bd. 68 (1979), 299 – 309, beschriebenen Transduktionsverfahren verwendet. Transformierte oder transduzierte Zellen werden auf das Cyclodextrinase codierende Gen hin untersucht und positive *E. coli*-Clone mit der Fähigkeit zur Herstellung von Cyclodextrinase werden erhalten.

Rekombinante DNA kann aus den positiven Clonen isoliert werden und nach den Methoden von Guerry, P., J. Bacteriology, Bd. 116 (1973), 1064 – 1066, oder Clewell, D.B., J. Bacteriology, Bd. 110 (1972), 667 – 676, gereinigt werden. Das Cyclodextrinase-Gen wird unter Verwendung der Taq-Polymerase nach der Sanger/Dideoxymutationsmethode sequenziert (SEQ ID Nr. 4). Die primäre Aminosäuresequenz des durch das Gen codierten Peptids wird anschließend bestimmt (SEQ ID Nr. 1).

Rekombinante DNA enthaltende positive E. coli-Transformanten werden zur Herstellung von Cyclodextrinase verwendet. Die Kultivierung wird nach dem gleichen aeroben Kultivierungsverfahren durchgeführt wie es für typische Mikroorganismen verwendet wird, vorzugsweise mittels eines Schüttelkulturverfahrens und eines Belüftungsrührkulturverfahrens unter Verwendung eines flüssigen Mediums. Das Kulturmedium kann einen oder mehrere Stickstoffquellen ausgewählt aus der Gruppe Hefeextrakt, Pepton, Fleischextrakt, Maisquellwasser oder Exsudat von Sojabohnen oder Weizen koji, eines oder mehrere anorganische Salze, ausgewählt aus der Gruppe Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Magnesiumsulfat, Eisensulfat oder Magnesiumsulfat und gegebenenfalls Kohlenhydrate oder Vitamine enthalten. Der pH-Wert des Kulturmediums liegt zu Beginn vorzugsweise bei 7 – 9. Die Kultivierung wird für 4 bis 24 Stunden, vorzugsweise für 6 bis 24 Stunden bei 30 bis 42° C, vorzugsweise bei 37° C, durchgeführt.

Nach beendetem Wachstum wird die Cyclodextrinase aus der Kultur nach dem üblichen Verfahren zum Gewinnen von Enzymen isoliert. Beispielsweise werden die Bakterienzellen zum Freisetzen des Enzyms physikalisch mittels Ultraschallbehandlung oder mit einem Mörser/Pistill aufgebrochen, oder sie werden chemisch unter Verwendung eines Enzyms, wie Lysozym, oder von Toluol (Bakterienzellen werden mit diesen Reagentien entweder mit oder ohne Schütteln inkubiert) lysiert. Die Lysate werden filtriert, unlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert. Wenn nötig, wird die Nukleinsäure unter Verwendung von Streptomycinsulfat, Protaminsulfat oder Magnesiumsulfat entfernt. Die erhaltene Lösung wird anschließend unter Verwendung von Ammoniumsulfat, Alkohol und Aceton fraktioniert und die Fällung aufbewahrt. Die Fällung wird in Wasser aufgenommen und gegen Wasser dialysiert. Der Rückstand wird zum Gewinnen von rohem Enzym gefriergetrocknet. Das rohe Enzym wird mittels verschiedener chromatographischer Methoden einschließlich Ionenaustauschchromatographie, wie DEAE-Sephrose (Diethylaminoethyl-Sephrose, Pharmacia K.K.) und DEAE-Sephadex (Pharmacia K.K.), oder mittels Gelfiltration unter Verwendung von Sephadex G-200 (Pharmacia K.K.) und Biorad P-150 (Biorad) gereinigt. Wenn nötig, kann zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Reinigungstechniken Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung von Ionenaustauschchromatographie (TSK-Gel DEAE-5PW, Tosoh Corporation) von hydrophober Chromatographie (TSK-Gel Phenyl 5PW, Tosoh Corporation) und Gelfiltration (TSK-Gel G3000SW, Tosoh Corporation) verwendet werden. Nach der Reinigung wird hochgereinigte Cyclodextrinase erhalten.

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der gereinigten Cyclodextrinase entsprechen denen der in Biochem. Biophys. Acta. Bd. 1036 (1990), 1 – 5, beschriebenen Cyclodextrinase.

Die vorliegende Erfindung stellt somit ein industriell sehr brauchbares Verfahren zur Herstellung großer Mengen Cyclodextrinase bereit, wobei zu der Gattung Escherichia gehörende Bakterien mit rekombinanter DNA, die ein Cyclodextrinasegen enthaltendes DNA-Fragment enthält, transformiert und die Transformanten in einem Kulturmedium gezüchtet werden. Das Enzym wird aus dem Kulturmedium gewonnen.

Die Erfindung wird in den Beispielen näher erläutert.

Herstellung von chromosomaler DNA von Bacillus sphaericus E-244

100 ml eines Flüssigmediums (1% β -Cyclodextrin, 1% Pepton, 0,5% Natriumchlorid, 0,1% Hefeextrakt, Leitungswasser/pH 7,0) wurden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben 20 Minuten bei 120° C sterilisiert. Mit einer Impföse wurde aus einer Schrägkultur von Bacillus sphaericus E-244 (FERM BP-2458) das Kulturmedium angeimpft und die Kultur für einen Tag bei 30° C unter Schütteln inkubiert. 1 ml der Eintageskultur wurde zu 10 ml eines in einem großen Versuchsgefäß befindlichen Kulturmediums (das wie vorstehend beschrieben die gleichen Nährstoffe enthielt und in der gleichen Art und Weise sterilisiert wurde) gegeben. Das Gemisch wurde unter Schütteln (bei 120 Upm) 2 Tage bei 30° C inkubiert. Nach dem Wachstum wurde die Kultur 20 min bei 5000 \times g zentrifugiert. Etwa 50 mg der so erhaltenen Bakterienzellen wurden zur Extraktion chromosomaler DNA nach dem Verfahren von Saito und Miura, Biochem. Biophys. Acta. Bd. 72 (1963), 619, verwendet. 60 μ g der chromosomalen DNA, 10 Einheiten BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.) und 40 μ l 50 mM Tris-HCl/pH 7,4 mit 100 mM Natriumchlorid und 10 mM Magnesiumsulfat wurden gemischt und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Gemisch mit Phenol extrahiert und der Extrakt mit Ethanol gefällt. Die Fällung wurde resuspendiert und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm versetzt, um Selbstligation des DNA-Fragmentes zu verhindern. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde nach dem in Maniatis et al., Molecular Cloning, 2. Auflage (1989), 133 – 134, beschriebenen Verfahren ausgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit Phenol extrahiert und der Extrakt mit Ethanol gefällt. Es wurden 50 mg BamHI gespaltenen chromosomaler DNA-Fragmente von Bacillus sphaericus E-244 erhalten.

Chromosomale DNA-Bibliothek von Bacillus sphaericus E-244 im Plasmidvektor pUC 118

20 mg von pUC118 DNA (Takara Shuzo Co., Ltd.), 10 Einheiten von BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.) und 20 ml 50 mM Tris-HCl/pH 7,4 mit 100 mM Natriumchlorid sowie 10 mM Magnesiumsulfat wurden gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Gemisch mit Phenol extrahiert und der Extrakt mit Ethanol gefällt.

1 μ g der BamHI gespaltenen pUC118 DNA, 1 μ g der BamHI gespaltenen chromosomalen DNA-Fragmente von Bacillus sphaericus E-244 und Reagentien eines DNA-Ligasekits (Takara Shuzo Co., Ltd.) wurden gemischt

und 16 Stunden bei 16°C inkubiert. 10 µl der rekombinante DNA enthaltenden Lösung wurden zu 100 µl kompetenter Zellen von *E. coli* JM 109 (Takara Shuzo Co., Ltd.) gegeben. Das Gemisch wurde für 20 Minuten auf Eis gestellt. 110 µl des Gemisches wurden zu 3 ml eines sterilen T-Y-Mediums [1% (Gew./Vol.) Bacto-trypton (Difco), 0,5% (Gew./Vol.) Hefeextrakt (Difco), 0,5% (Gew./Vol.) Natriumchlorid, pH 7,2] gegeben und unter Schütteln 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 µl jeder Kultur auf sterilen X-Gal-Platten (9 cm Durchmesser) ausgestrichen, die 20 ml eines Kulturmediums [1% (Gew./Vol.) Bacto-trypton (Difco), 0,5% (Gew./Vol.) Hefeextrakt (Difco), 0,5% (Gew./Vol.) Natriumchlorid, 1,5% Agar (pH 7,2) und 50 µg/ml (Gew./Vol.) filtersterilisiertes (Porengröße 0,22 µm) IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (Boehringer)), 40 µg/ml (Gew./Vol.) X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-galactopyranosid (Boehringer)), und 25 µg/ml (Gew./Vol.) Ampicillin (Sigma) enthielt. Die Platte wurde ohne Schütteln 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Auf der Platte wachsende weiße Kolonien wurden abgenommen und auf sterile X-Gal-Platten transferiert. Nach der Inkubation wurden etwa 3000 Transformanten auf der Platte erhalten (chromosomale DNA-Bibliothek).

Beispiel 3

Herstellung der DNA-Sondenmoleküle

100 ml eines Flüssigmediums (1% β-Cyclodextrin, 1% Pepton, 0,5% Natriumchlorid, 0,1% Hefeextrakt, Leitungswasser/pH 7,0) wurden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Mit einer Impföse einer Schrägkultur von *Bacillus sphaericus* E-244 (FERM BP-2458) wurde das Kulturmedium angeimpft und 1 Tag unter Schütteln bei 30°C inkubiert. 100 ml dieser Eintageskultur wurde zu 20 l eines Kulturmediums (das wie vorstehend beschrieben die gleichen Nährstoffe enthielt und in der gleichen Weise sterilisiert wurde) in ein 30 l-Kulturgefäß gegeben. Das Kulturgefäß wurde unter Rühren und Belüftung (bei 0,5 vvm, 220 Upm) 2 Tage bei 30°C inkubiert. Nach dem Wachstum wurde die Kultur bei 17000 × g zentrifugiert und ergab so etwa 230 g Bakterienzellen. Die Bakterienzellen wurden extrahiert und etwa 20 mg des gereinigten Enzyms wurden nach dem in Biochem. Biophys. Acta. Bd. 1036 (1990), 1 – 5, beschriebenen Verfahren erhalten. 1 mg des gereinigten Enzyms wurde lyophilisiert. Nach der Lyophilisation wurde das Enzym in 100 µl 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA) aufgelöst. Die Lösung wurde zur Proteinsequenzierung [Applied Biosystem Inc. (ABI)] verwendet und die N-terminale primäre Aminosäuresequenz des Enzyms bestimmt. 1 mg gereinigtes Enzym, 30 mg Cyanobromimid, 2,1 ml Ameisensäure und 0,9 ml vollentsalztes Wasser wurden in einen Rundkolben gegeben und die Öffnung des Kolbens wurde verstopft. Der Kolben wurde im Dunkeln 24 Stunden bei 25°C inkubiert und geschüttelt, um das Enzym in Peptidfragmente zu zerlegen. Die entstehende Peptidlösung wurde in einem Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck getrocknet. Die getrockneten Peptidfragmente wurden in 0,4 ml einer 0,2 N Essigsäure gelöst. Die Peptidlösung wurde einer HPLC unter Verwendung einer mit 0,1% Trifluoressigsäure äquilibrierten gepackten Säule [5C₄-300, Durchmesser 4,6 mm × 250 mm, (Nacalai Tesque Co.)] unterworfen. Nachdem die Peptide adsorbiert hatten, wurde 80%ige Acetonitril-Gradientenlösung auf die Säule gegeben. Jede Peptidfraktion wurde gesammelt, unter vermindertem Druck getrocknet und in 100 ml einer 0,1%igen Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Jede Peptidlösung wurde mittels des Proteinsequenzierers untersucht und die primäre Aminosäuresequenz jedes Peptides bestimmt.

Die N-terminale Aminosäuresequenz der Cyclodextrinase ist in SEQ Nr. 2 und die primäre Aminosäuresequenz eines Peptids in SEQ Nr. 3 angegeben.

Einem Teil der N-terminalen Aminosäuresequenz entsprechend wurden 20 Nukleotidreste mittels einer DNA-Synthesemaschine (Beckman) für einen DNA-Primer (i) synthetisiert. Ähnlich wurden 27 Nukleotidreste für einen DNA-Primer (ii) synthetisiert, die komplementär zu der von einem Teil der Aminosäuresequenz eines Peptidfragmentes abgeleiteten Nukleotidsequenz sind. Die DNA-Sequenz zwischen den Primern (i) und (ii) wurde unter Verwendung einer thermocyclischen PCR-Maschine (Perkin Elmer Cetus) mittels der Primer (i) und (ii), der in Beispiel 1 hergestellten chromosomalen DNA von *Bacillus sphaericus* E-244 ("template") und eines "Polymerase chain reaction"-Kits (Perkin Elmer Cetus) amplifiziert.

Das amplifizierte DNA-Fragmente enthaltene Reaktionsgemisch wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA wurde extrahiert, mit Ethanol gefällt und in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nicht-radioaktive DNA-Sondenmoleküle wurden aus der DNA-Lösung unter Verwendung eines nicht-radioaktiven DNA-Markierungs- und Nachweiskits (Boehringer) hergestellt.

Beispiel 4

Nachweis von Cyclodextrinase-Genen

Die in Beispiel 2 hergestellte chromosomale DNA-Bibliothek wurde unter Verwendung nicht radioaktiver DNA-Sondenmoleküle nach dem Kolonie-Hybridisierungsverfahren (Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, zweite Auflage, (1989), 90 – 99), untersucht. Die Hybridisierung wurde mittels eines nicht-radioaktiven DNA-Markierungs- und Nachweiskits (Boehringer) nachgewiesen. Unter 3000 Kolonien in der chromosomalen DNA-Bibliothek wurde ein einziger positiver Clon gefunden. Der Positive Clon wurde mittels einer Impföse in 3 ml steriles T-Y-Medium überimpft, das wie vorstehend beschrieben hergestellt wurde, und 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Wachstum wurde die Kultur 20 Minuten bei 5000 × g zentrifugiert und ergab 2 mg Bakterienzellen. Die das Cyclodextrinase-Gen enthaltende Plasmid-DNA wurde aus den Bakterienzellen nach dem Alkaliverfahren (Maniatis T., et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, zweite Auflage (1989), 25 – 28) extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt und die Fällung in 200 µl

TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. 10 µl der DNA-Suspension, 1 Einheit SacI (Boehringer), 1 Einheit BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.), 2 µl Reaktionspuffer (Boehringer) und 10 µl sterilisierten Wassers wurden gemischt und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 1 µg pUC118-Vektor-DNA, 1 Einheit SacI (Boehringer), 1 Einheit BamHI (Takara Shuzo Co. Ltd.), 2 µl Reaktionspuffer (Boehringer) und 10 µl sterilisiertes Wasser wurden gemischt und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Spaltung wurde das Insert und die Vektor-DNA unter Verwendung eines Ligasekits 16 Stunden bei 16°C ligiert. Das Ligasegemisch wurde dann dazu verwendet, E. coli JM 109 nach dem in J. of Bacteriology, Bd. 119 (1974), 1072–1074, beschriebenen Verfahren zu transformieren. Die Transformanten wurden auf Cyclodextrinaseaktivität hin untersucht. Es wurde eine positive Transformante erhalten.

Die so erhaltene Transformante E. coli JM109 (pCD722) wurde am 4.02.1991 beim Fermentation Research Institute, Agency of Science and Industrial Technology, hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer FERM BP-3263.

Aus 10 ml einer E. coli JM109 (pCD722)-Kultur wurde nach dem Alkaliverfahren (Maniatis T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Auflage (1989), 25–28), 20 g Plasmid-DNA erhalten. Die Plasmid-DNA wurde als pCD722 bezeichnet. 1 µg pCD722-DNA wurde mit einer Kombination von SacI, EcoRI (Boehringer) und BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.) gespalten. Nach der Spaltung wurde das Spaltungsgemisch auf einem 0,7 oder 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der DNA-Bande wurde bestimmt und eine Restriktionskarte erstellt.

Beispiel 5

E. coli JM109 (pCD722) Kultur und Herstellung des rohen Enzyms

E. coli JM109 (pCD722) (FERM BP 3263) wurde unter Schütteln 16 Stunden bei 37°C in 3 ml eines T-Y-Mediums inkubiert. Die Kultur wurde auf Eis 2 Minuten ultraschallbehandelt und das Gemisch aus aufgebrochenen Bakterienzellen 20 Minuten bei 10 000 × g zentrifugiert. Nach Entfernen der Zellreste wurde ermittelt, daß der ungereinigte Enzymextrakt 3 Einheiten pro ml Cyclodextrinaseaktivität aufwies. Vergleichsweise wurde pUC118 enthaltender E. coli JM109 wie vorstehend beschrieben kultiviert und die Cyclodextrinaseaktivität des Extraktes untersucht. In dem Extrakt wurde keine Enzymaktivität gefunden.

Beispiel 6

Analyse der Nukleotidsequenz des aus Bacillus sphaericus E-244 (FERM BP-2458) stammenden Cyclodextrinase-Gens

10 µg der in Beispiel 4 erhaltenen pCD722 DNA, 1 Einheit SacI (Boehringer), 1 Einheit BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.), 2 µl Reaktionspuffer (Boehringer) und 10 µl sterilisiertes Wasser wurden gemischt und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Spaltung wurde das Spaltungsgemisch auf einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein interessierendes DNA-Fragment wurde aus dem Gel extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Es wurden 5 µg gereinigte DNA erhalten.

1 µg Vektor-DNA von pUC119, 1 Einheit SacI (Boehringer), 1 Einheit BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd.), 2 µl Reaktionspuffer (Boehringer) und 19 µl sterilisiertes Wasser wurden gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Spaltung wurde das Vektor-DNA-Gemisch und etwa 2,5 µg der gereinigten DNA 16 Stunden bei 16°C ligiert. Das Ligasegemisch wurde anschließend dazu verwendet, E. coli JM109 nach dem in J. of Bacteriology, Bd. 119 (1974), 1072–1074, beschriebenen Verfahren zu transformieren. Die Transformanten wurden auf Cyclodextrinaseaktivität hin untersucht. Es wurde eine positive Transformante erhalten. Etwa 20 µg Plasmid-DNA wurde nach dem Alkaliverfahren (Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, zweite Auflage (1989), 25–28), aus 10 ml einer Kultur des transformierten E. coli JM109 erhalten. Die Plasmid-DNA wurde als pCD722' bezeichnet. pCD722' enthielt das gleiche DNA-Fragment wie pCD722, jedoch war das Cyclodextrinase-Genfragment der pCD722'-DNA umgekehrt orientiert.

Nach der Methode von Henikoff, Gene, Bd. 28 (1984), 351–359, wurden unter Verwendung eines "kilosequence" Deletionskits (Takara Shuzo Co., Ltd.) in die rekombinanten Plasmide pCD722 und pCD722' unterschiedliche Deletionen ausgeführt. Die rekombinanten Plasmide wurden wie in Beispiel 4 beschrieben zur Transformation von E. coli JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.) verwendet. Nach der Methode von Messing (Methods in Enzymology, Bd. 101 (1983), 20–78, wurden zur Herstellung einzelsträngiger DNA die Transformanten mit Helferphagen M13K07 (Takara Shuzo Co., Ltd.) infiziert. Die einzelsträngige DNA wurde unter Verwendung eines Taq Polymerasesequenzierkits [(Applied Biosystem Instrument (ABI)) und einer DNA-Sequenziermaschine [(Applied Biosystem Instrument (ABI))] sequenziert.

Die gesamte aus Bacillus sphaericus E-244 (FERM BP-2458) stammende Nukleotidsequenz des Cyclodextrinasegens ist in SEQ ID Nr. 4 gezeigt. Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete primäre Aminosäuresequenz ist in SEQ ID Nr. 1 gezeigt.

SEQ ID Nr. 1

ART DER SEQUENZ: Aminosäure

SEQUENZLÄNGE: 591 Aminosäuren

STRANGFORM:

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Peptid

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS:

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE:

MERKMALE:

EIGENSCHAFTEN:

	MetIleMetLeuGluAlaValTyrHisArgMetGlyGlnAsnTrpSerTyrAlaTyrAsn	20
30	AspSerThrLeuHisIleArgIleArgThrLysArgAspAsnValProArgIleAspLeu	40
	HisCysGlyGluLysTyrAspProGluLysTyrLysGluThrIleProMetGluArgMet	60
35	AlaSerAspGlyLeuPheAspTyrTrpGlnAlaAlaValGlnProArgTyrArgArgLeu	80
	ValTyrTyrPheAlaLeuHisSerAspAsnGlyAspAlaValTyrPheMetGluLysGly	100
40	PhePheAspGlnProProLysValMetTyrGluGlyLeuPheAspPheProTyrLeuAsn	120
	ArgGlnAspValHisThrProProAlaTrpValLysGluAlaIlePheTyrGlnIlePhe	140
	ProGluArgPheAlaAsnGlyAspProSerAsnAspProGluGlyValGlnGluTrpGly	160
45	GlyThrProSerAlaGlyAsnPhePheGlyGlyAspLeuGlnGlyValIleAspHisLeu	180
	AspTyrLeuSerAspLeuGlyValAsnAlaLeuTyrPheAsnProLeuPheAlaAlaThr	200
50	ThrAsnHisLysTyrAspThrAlaAspTyrMetLysIleAspProGlnPheGlyThrAsn	220
	GluLysLeuLysGluLeuValAspAlaCysHisAlaArgGlyMetArgValLeuLeuAsp	240
55	AlaValPheAsnHisCysGlyHisThrPheProProPheValAspValLeuAsnAsnGly	260
	LeuAsnSerArgTyrAlaAspTrpPheHisValArgGluTrpProLeuArgValValAsp	280
60	GlyIleProThrTyrAspThrPheAlaPheGluProIleMetProLysLeuAsnThrGly	300
	AsnGluGluValLysAlaTyrLeuLeuAsnValGlyArgTyrTrpLeuGluGluMetGly	320

LeuAspGlyTrpArgLeuAspValAlaAsnGluValAspHisGlnPheTrpArgGluPhe	340	
ArgSerGluIleLysArgIleAsnProSerAlaTyrIleLeuGlyGluIleMetHisAsp	360	
SerMetProTrpLeuGlnGlyAspGlnPheAspAlaValMetAsnTyrProPheThrAsn	380	5
IleLeuLeuAsnPhePheAlaArgArgLeuThrAsnAlaAlaGluPheAlaGlnAlaIle	400	
GlyThrGlnLeuAlaGlyTyrProGlnGlnValThrGluValSerPheAsnLeuLeuGly	420	10
SerHisAspThrThrArgLeuLeuThrLeuCysSerGlyAsnValGluArgMetLysLeu	440	
AlaThrLeuPheGlnLeuThrTyrGlnGlyThrProCysIleTyrTyrGlyAspGluIle	460	15
GlyMetAspGlyGluTyrAspProLeuAsnArgLysCysMetGluTrpAspLysSerLys	480	
GlnAsnThrGluLeuLeuAlaPhePheArgSerMetIleSerLeuArgLysAlaHisPro	500	20
AlaLeuArgGlySerGlyLeuArgPheLeuProValLeuGluHisProGlnLeuLeuVal	520	
TyrGluArgTrpAspAspAsnGluArgPheLeuIleMetLeuAsnAsnGluAspAlaPro	540	25
ValAsnValValIleProAlaAlaGlnProGlyAlaSerTrpArgThrValAsnGlyGlu	560	
ProCysAlaValValGluGluSerSerIleGlnAlaAlaLeuProProTyrGlyTyrAla	580	30
IleLeuHisAlaProIleAlaGlyThrAlaGlu	591	

SEQ ID Nr. 2

ART DER SEQUENZ: Aminosäure

SEQUENZLÄNGE: 24 Aminosäuren

STRANGFORM:

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Peptid

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS:

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE:

MERKMALE: N-terminales Fragment

EIGENSCHAFTEN:

DE 42 04 476 A1

Met Ile Met Leu Glu Ala Val Tyr His Arg Met Gly Gln Asn Trp 15

Ser Tyr Ala Tyr Asn Asp Ser Thr Leu 24

SEQ ID Nr. 3

ART DER SEQUENZ: Aminosäure

SEQUENZLÄNGE: 11 Aminosäuren

STRANGFORM:

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Peptid

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS:

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE:

MERKMALE: Mittlerer Bereich eines Peptidfragments

EIGENSCHAFTEN:

Pro Trp Leu Gln Gly Asp Gln Phe Asp Ala Val 11

SEQ ID Nr. 4

ART DER SEQUENZ: Nukleotid

SEQUENZLÄNGE: 1773 Basen

STRANGFORM:

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: chromosomale DNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Bacillus sphaericus

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE: E-244

MERKMALE:

EIGENSCHAFTEN:

ATGATTATGC TGGAAGCCGT TTACCACCGG ATGGGACAAA ACTGGTCCTA TGCCTACAAT	60	5
GATTCGACCT TGCATATCCG CATCCGCACC AAGCGGGACA ATGTCCCGCG CATCGACCTG	120	
CACTGCGGCG AGAAGTACGA TCCGGAGAAG TACAAGGAAA CCATTCCCAT GGAGCGTATG	180	10
GCTTCTGACG GACTGTTTGA TTATTGGCAA GCCGCCGTGC AGCCCAGATA CCGTAGATTA	240	
GTTTATTACT TCGCGCTGCA TTCCGACAAC GGCATGCCG TTTACTTTAT GGAGAAGGGA	300	15
TTCTTTGATC AGCCGCCCAA GGTGATGTAT GAAGGATTGT TCGACTTCCC TTATCTGAAT	360	
CGGCAGGATG TGCACACGCC TCCGGCATGG GTTAAGGAAG CGATATTCTA TCAGATTTTC	420	20
CCCGAGCGCT TCGCGAACGG CGATCCGTCC AACGATCCCG AAGGCGTGCA GGAATGGGGA	480	
GGTACGCCCC GCGCCGGCAA TTTCTTCGGC GGGGATTTC AAGGCGTGAT CGATCATCTG	540	25
GACTATCTAA GCGATCTGGG CGTTAATGCT TTGTATTTC ACCCCCTATT CGCGGCCACC	600	
ACCAACCATA AATACGATAC GCGGACTAT ATGAAGATCG ACCCCCAATT CGGCACGAAC	660	30
GAAAAGCTCA AGGAGCTGGT CGATGCCTGC CATGCCCGGG GCATGCGCGT GCTGCTGGAC	720	
GCCGTGTTCA ACCACTGCGG CCATACGTTT CCGCCGTTCG TGGACGTGTT GAACAACGGT	780	35
CTGAATTCG GTTACGCGGA TTGGTTCAT GTTCGGGAAT GGCTCTGCG GGTCGTTGAC	840	
GGGATTCCGA CCTACGATAC GTTCGCATTC GAACCAATCA TGCCCAAGCT CAATACCGGC	900	
AATGAAGAAG TGAAGGCTTA CCTGTTGAAT GTCGGCCGTT ACTGGCTGGA GGAGATGGGG	960	40
CTGGACGGCT GCGGGCTGGA TGTCGCCAAT GAGGTGGACC ATCAATTCTG GCGGGAATTC	1020	
CGGAGCGAGA TCAAACGGAT CAATCCTTCG GCCTATATCT TAGGCGAGAT TATGCATGAT	1080	45
TCCATGCCGT GGCTGCAAGG CGACCAATTC GACGCGGTCA TGAATTATCC CTTCACGAAC	1140	
ATCCTGCTGA ACTTCTTCGC CCGCAGGCTG ACGAACGCGG CCGAATTCGC CCAGGCGATC	1200	50
GGCAGCGAGC TCGCCGGTTA TCCGCAGCAG GTTACGGAAG TGTCATTCAA TCTGCTCGGC	1260	
AGCCATGACA CGACGAGGCT ATTGACGTTG TGCAGCGGCA ATGTGGAGCG CATGAAGCTG	1320	55
GCGACCTTAT TCCAGCTGAC CTATCAGGGG ACGCCATGCA TCTATTACGG CGACGAGATC	1380	
GGCATGGACG GCGAGTATGA CCCCCTCAAC CGCAAGTGCA TGAATGGGA CAAGAGCAAG	1440	60
CAGAATACGG AGCTGCTTGC GTTCTTCCGG AGCATGATCA GCCTGCGCAA GGCTCACCT	1500	65

5 GCGCTGCGCG GAAGCGGACT GCGCTTCCTG CCGGTGCTGG AGCACCCGCA GTTGCTGGTC 1560
TATGAGCGCT GGGACGATAA TGAGCGATTC CTCATCATGC TGAATAATGA GGATGCTCCC 1620
GTGAACGTTG TTATCCCGGC AGCTCAGCCC GCGGCTTCTT GCGGCACCGT GAACGGCGAG 1580
CCATGCGCAG TAGTCGAGGA AAGTTCGATA CAGGCGGCTC TCCCTCCTTA CGGTTATGCC 1740
10 ATACTGCATG CGCCTATAGC AGGAACGGCT GAG 1773

Patentansprüche

- 15 1. Cyclodextrinase-Gen, das für eine in SEQ ID Nr. 1 gezeigte Aminosäuresequenz codiert.
2. Cyclodextrinase-Gen, das die in SEQ ID Nr. 4 gezeigte Nukleotidsequenz umfaßt.
3. Rekombinante DNA, die die Nukleotidsequenz des Cyclodextrinasegens nach Anspruch 1 oder 2 umfaßt.
4. Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinase, dadurch gekennzeichnet, daß ein zur Gattung Escheri-
chia gehörender Mikroorganismus, der eine rekombinante DNA mit dem Cyclodextrinase-Gen enthält, in
20 einem Kulturmedium kultiviert wird und daß Cyclodextrinase aus der Kultur gewonnen wird.